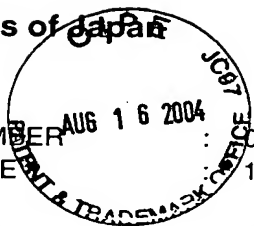


# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan



PUBLICATION NUMBER : 06135836  
PUBLICATION DATE : 17-05-94

APPLICATION DATE : 28-10-92  
APPLICATION NUMBER : 04290509

APPLICANT : MINOFUAAGEN SEIYAKU HONPO:GOUSHI;

INVENTOR : UTSUNOMIYA KYOZO;

INT.CL. : A61K 31/70 A61K 31/70 // C07H 15/256

TITLE : INDUCER FOR CONTRA-SUPPRESSOR CELL

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain an inducer for contra-suppressor cell and a therapeutic agent for low immunopathy.

CONSTITUTION: Glycyrrhizin as an active ingredient is mixed with a base of medicine. When an inducer for contra-suppressor cell thus obtained is administered, a contra-suppressor cell is induced. The induced contra-suppressor cell suppresses eruption of inhibitory suppressor cell, a main cause for low immunopathy and its action and alleviates and treats opportunistic infective disease.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-135836

(43) 公開日 平成6年(1994)5月17日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup> A 61 K 31/70 // C 07 H 15/256	識別記号 A B D A E D	庁内整理番号 8314-4C Z	F I	技術表示箇所
---	------------------------	------------------------	-----	--------

審査請求 未請求 請求項の数3 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平4-290509

(22) 出願日 平成4年(1992)10月28日

(71) 出願人 000170358

合資会社ミノファーゲン製薬本舗  
東京都新宿区四谷3丁目2番地7

(72) 発明者 鈴木 富士夫

アメリカ合衆国 テキサス州 77551 ガ  
ルベストン市 シャンテリー サークル  
7714

(72) 発明者 ボラード ビルド リチャード

アメリカ合衆国 テキサス州 77551 ガ  
ルベストン市 サン マリノ 168

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)

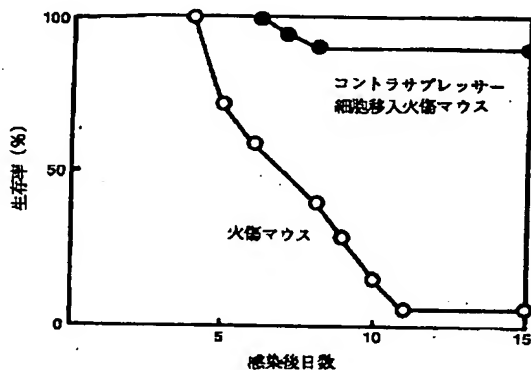
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コントラサプレッサー細胞の誘導剤

(57) 【要約】

【目的】 コントラサプレッサー細胞の誘導剤、及び低免疫症の治療剤を提供する。

【構成】 グリチルリチンを有効成分として、薬品基剤に配合する。こうして得られるコントラサプレッサー細胞の誘導剤を投与すると、コントラサプレッサー細胞が誘導される。誘導されたコントラサプレッサー細胞は、低免疫症の要因である抑制細胞の出現及びその作用を抑制し、日和見感染を軽減・治療する。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリチルリチンを有効成分とするコントラサプレッサー細胞の誘導剤。

【請求項2】 コントラサプレッサー細胞の誘導を介したグリチルリチンを有効成分とする低免疫症の治療剤。

【請求項3】 健康人でのコントラサプレッサー細胞を誘導し、このコントラサプレッサー細胞を取得し、患者に移入することにより日和見感染を予防又は治療するために用いる請求項1記載のコントラサプレッサー細胞の誘導剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コントラサプレッサー細胞の誘導剤、及び低免疫症の治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 低免疫症は、癌などの基礎的疾患、ストレス、大怪我や火傷、臓器移植後の移植拒否剤の使用により、あるいは老化時等に、しばしば誘発されることが知られている（サージェリイ(Surgery) 156, 233 (1983)、イムノロジー・トゥデイ(Immunology Today) 11, 170 (1990)、アドバンス・イン・ホスト・ディフェンス・メカニズム(Advances in Host defense Mechanisms) 6, 81 (1986)、トランスプランテーション・プロシディンクス(Transplantation Proceedings) 23, 2175 (1991)および、アドバンス・イン・イムノロジー(Advances in Immunology) 29, 287 (1980)等)。

【0003】 また細菌やウイルスなどの微生物による感染自体も低免疫症の一因となり、近年大きな問題となっているAIDSは低免疫症が誘引される顕著な例である。ところで、癌や火傷などにより低免疫症に陥った患者血清中からは、通常量に比し明らかに高い量のプロスタグランジンE<sub>2</sub>（アーチプス・オブ・サージェリイ(Archives of Surgery) 123, 293 (1988)）、ステロイド（ジャーナル・オブ・バーン・ケア・リハビリテーション(Journal of Burn Care Rehabilitation) 5, 143 (1984)）、形質転換増殖因子-β（ジャーナル・オブ・クリニカル・イムノロジー(Journal of Clinical Immunology) 11, 95 (1991)）など様々な液性の免疫抑制物質が見つかり、これらが低免疫症誘引の一因になっていると推定できる。

【0004】 さらに、これら低免疫症の患者では、インターフェロン産生能（ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology) 129, 1806 (1982)）、インターロイキン2産生能（クリニカル・エクスペリメンタル・イムノロジー(Clinical Experimental Immunology) 65, 570 (1986)）、あるいは胸腺由来細胞依存の細胞殺傷作用（トランスプランテーション(Transplantation) 33, 422 (1982)）、ナチュラルキラー細胞依存の細胞殺傷作用（セルラー・イムノロジー(Cellul ar Immunology) 86, 551 (1984)）などの免疫反応を低

2

下せしめる機能を有する抑制細胞（抑制マクロファージ、抑制Tリンパ球、抑制Bリンパ球）が出現し、低免疫症誘引に重要な役割を呈している。

【0005】 例えば、抑制細胞が宿主の腫瘍抵抗性を著しく抑制する事実は、Northら（ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(Journal of Experimental Medicine) 159, 1295 (1984)）の拒癌マウスを使った実験で明らかである。すなわち、マウスの同種移植系でMeth A 腫瘍を用いた場合、移植後9日後をピークに随伴免疫を司る抗腫瘍エフェクター細胞が検出されるが、その後は抑制細胞の出現によりエフェクター細胞の活性が排除され、その結果として更に激しい腫瘍の増殖が進行する。

【0006】 一方、臓器移植の場合には、移植された臓器に対する拒否反応を抑制するために、サイクロスポリンA（トランスプランテーション・プロシディンクス(Transplantation Proceedings) 23, 2180 (1991)）、0 KT 3（ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(The New England Journal of Medicine) 313, 337 (1985)）などの免疫抑制剤が開発され、臨床の場で利用できるようになったので、臓器移植患者の生存日数は確実に伸長している。

【0007】 しかしながら、これら免疫抑制剤により、T細胞の抑制（ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology) 128, 355 (1982)）や抑制T細胞の誘導（クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・イムノロジー(Clinical and Experimental Immunology) 71, 369 (1988)）が促され、その結果として患者の細胞性免疫が顕著に低下し、やがて常在菌や空中雑菌ですら排除できなくなり、多くの場合患者は敗血症などで死に至る。

【0008】 火傷では、その物理的損傷による直接的な死は、呼吸および水分管理などを含めた現代治療医学の進歩により殆ど回避できるようになったものの、低免疫症により併発する日和見感染が原因となる敗血症などによる死が大きな問題となっている。

【0009】 火傷マウス由来の抑制細胞を、非火傷マウスに移入すると、移入されたマウスのヘルペスウイルスに対する感染感受性が顕著に増大することから、火傷宿主のヘルペスウイルス感染に対する感染感受性の上昇は、火傷マウス脾に存在する抑制T細胞に依存することが確かめられた。

【0010】 クーパーら（ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ(Journal of Surgical Research) 38, 606 (1985)）が敗血症モデルを用いて行った動物実験では、抑制細胞（Lyt2<sup>+</sup> T細胞）の移入は、本モデルでの平均死亡率15%を92%にまで上昇させた。また、この際抑制細胞が産生する抑制因子に対する単一抗体を同時に投与すると、この様な死亡率の上昇は認められなかった。この事実は、抑制細胞の日和見感染誘引における重

要性を明白にし、更に抑制細胞やその可溶性因子の働きを阻止すれば、火傷宿主の感染抵抗性を非火傷の状態にまで引き戻すことが出来る事を物語る。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】低免疫症個体から、その一因となっている抑制細胞を取り除くため、これまでに、X線照射（*キャンサー・イムノロジー・アンド・イムノセラピー* (Cancer Immunology and Immunotherapy) 16, 175 (1984))、トピカル セリウム ナイトレイト（*サージェリイ* (Surgery) 99, 53 (1986))、メルフェラン（*キャンサー・イムノロジー・アンド・イムノセラピー* (Cancer Immunology and Immunotherapy) 20, 209 (1985)) やサイクロフォスファミド（*ネイチャー* (Nature) 262, 77 (1976)) などのアルキル化剤、シメチジン（*ザ・ジャーナル・オブ・トラウマ* (The Journal of Trauma) 25, 131 (1985)) やラニチジン（*ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー* (The Journal of Immunology) 132, 3054 (1984)) などのヒスタミンの2型受容体阻害剤、プロスタグランジンE<sub>2</sub>産生阻害作用を示すインドメタシン（*ジャーナル・オブ・バイオロジカル・レスポンス・モディファイヤーズ* (Journal of Biological Response Modifiers) 7, 568 (1988))、アスピリン（*ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー* (British Journal of Cancer) 38, 503 (1978))、イブプロフェン（*サージェリイ* (Surgery) 97, 721 (1985)) などの非ステロイド系抗炎症薬、その他ボリミキシンB（*ジャーナル・オブ・バーン・ケア・リハビリテーション* (Journal of Burn Care Rehabilitation) 10, 213 (1989))、アクラシノマイシンA（*イムノファーマコロジー* (Immunopharmacology) 10, 19 (1985))、ヘパタミノールAMP（*ジャパン・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー* (Japan Journal of Pharmacology) 48, 417 (1988))、プロカイナミド（*クリニカル・アンド・インベスティガティブ・オブ・メディスン* (Clinical and Investigative of Medicine) 11, 425 (1988))、リビドA誘導体（*インフェクション・アンド・イムニティ* (Infection and Immunity) 56, 1076 (1988))、OK-432（*インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー* (International Journal of Cancer) 26, 401 (1980)) など多くの方法や物質が諸々の実験系において取り上げられて来た。

【0012】しかしながら、抑制細胞を取り除くために開発された従来の方法は、ある程度の効果は評価できるものの、いづれも未だ不完全で、その他の効果的な方法の開発が強く望まれている。

【0013】ところで、抑制細胞の活性を効果的に、絶対的に抑制するものとして、抑制細胞のプロッカー細胞であるコントラサプレッサー細胞が報告されている（*アドバンシス・イン・キャンサー・リサーチ* (Advances in Cancer Research) 42, 277 (1984))。このコントラサ

プレッサー細胞は、抑制細胞が原因で誘発される1型ヘルペスウィルス（HSV-1）の日和見感染症に著効を示す。例えば、火傷マウスに10LD<sub>50</sub>量のHSV-1を腹腔感染させる1日前に、コントラサプレッサー細胞を静脈より移入すると、火傷マウスの95%が生じた。

【0014】本発明は、上記観点からなされたものであり、低免疫症患者の日和見感染等を効果的に軽減、治療するために、抑制細胞を取り除くことを目的とし、コントラサプレッサー細胞の誘導剤、及び日和見感染の軽減又は治療剤等、低免疫症の治療剤を提供することを課題とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、グリチルリチンがコントラサプレッサー細胞を誘導する作用を有し、誘導されたコントラサプレッサー細胞により日和見感染を軽減、治療することができることを見出し、本発明に至った。

【0016】すなわち本発明は、グリチルリチンを有効成分とするコントラサプレッサー細胞の誘導剤、及びグリチルリチンを有効成分とする低免疫症の治療剤である。

【0017】以下、本発明を詳細に説明する。

<1>コントラサプレッサー細胞の誘導剤、低免疫症の治療剤

本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤、あるいは低免疫症の治療剤は、グリチルリチンを有効成分とする。

【0018】グリチルリチンは、甘草由来のサポニンであり、1分子のグリチルレチン酸に2分子のグルクロン酸が結合した構造を有し、急性および慢性毒性が極めて低いことが特徴である。またグリチルリチンは、インターフェロン産生能などの宿主の免疫機構を増殖させる作用、宿主機能を介して発現される抗腫瘍効果や抗ウイルス効果を有し、慢性肝炎の治療薬として現在広く臨床場で使用されている。

【0019】本発明においては、剤型として、製薬上許容される無害の一種、あるいは数種の賦形剤、例えば、乳糖、バレイショデンプン、アルギン酸ナトリウム、又はアミノ酢酸、スレオニン、炭酸カルシウム等を配合した散剤、顆粒剤、糖衣錠、及びカプセル剤とすることができる。注射剤の場合、溶媒は単に注射蒸留水又は生理食塩水のみ、あるいは解毒アミノ酢酸等のアミノ酸を添加してもよい。

【0020】グリチルリチンは、注射用製剤として、システインとグリシンを加えた生理食塩水溶液が知られているが、本発明に好適に使用することができる。

【0021】<2>用法

本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤の投与量は、経口投与では、成人1日当たり200～400mg

5

g、非経口投与では成人1日当たり10～200mgの範囲で用いることにより、所期の効果が期待できる。

【0022】また、重度の患者においては、本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤、あるいは低免疫症の治療剤を投与しても、コントラサプレッサー細胞の効果的な誘導は、期待できない場合がある。そのような場合は、コントラサプレッサー細胞誘導剤を健康人に投与し、誘導されたコントラサプレッサー細胞を含む血液を低免疫症患者に輸血し、あるいはリンパ球画分を能動的トランスファーすることにより、日和見感染を軽減、治療することができる。

【0023】

【作用】以下に、本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤及び低免疫症の治療剤の作用を説明する。

【0024】＜1＞グリチルリチンのコントラサプレッサー細胞誘導効果

グリチルリチンのコントラサプレッサー細胞誘導作用を動物実験により説明する。

6

【0025】コントラサプレッサー細胞は、ピシア ヴィロサ レクチン(VVレクチン)に特異的に付着する性質を有する(ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(European Journal of Immunology) 11, 937(1981))ので、グリチルリチン投与動物のVVレクチン付着性細胞数の変化を調べた。

【0026】グリチルリチンを腹腔内(i.p.)投与した48時間後のマウス、ラット、モルモット由来脾リンパ球( $5 \times 10^7$ 個)を、VVレクチン( $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、2時間)処理を施した直径9cmのプラスチックシャーレに添加し、37℃、45分間培養した。レクチン非付着性細胞を除去した後、N-アセチル-D-ガラクトサミン( $1 \text{ mg/ml}$ )をシャーレに添加し、さらに15分間培養を続けることにより、VVレクチン付着性細胞をプレートから剥し、トリパンブルー染色法で生細胞数を血球計算盤にて計測した。結果を表1に示す。

【0027】

【表1】

	用量 (mg/kg)	投与 経路	動物	付着細胞数 ( $\times 10^4$ / 動物)	付着率 (%)
<b>実験1</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10 $\times$ 1	ip	マウス	150	15
<b>実験2</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	0.1 $\times$ 1	ip	マウス	100	10
	100 $\times$ 1	ip	マウス	200	20
<b>実験3</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10 $\times$ 1	sc	マウス	150	15
	10 $\times$ 1	iv	マウス	150	15
	10 $\times$ 1	po	マウス	150	15
<b>実験4</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10 $\times$ 1	ip	マウス	100	10
	10 $\times$ 5	ip	マウス	150	15
	10 $\times$ 10	ip	マウス	200	20
<b>実験5</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10 $\times$ 2	ip	マウス	200	—
強ミノC	10 $\times$ 2	ip	マウス	200	20
<b>実験6</b>					
コントロール			ラット	<1	—
グリチルリチン	10 $\times$ 2	ip	ラット	1000	20
<b>実験7</b>					
コントロール			モルモット	<1	—
グリチルリチン	10 $\times$ 2	ip	モルモット	3200	20

【0028】この結果から明かなように、グリチルリチン投与マウス由来の脾リンパ球中に、VVレクチン付着性細胞の顕著な増加を認めた。また、対照の生理食塩水投与群ではVVレクチン付着性細胞は殆ど検出されなかった。このことから、グリチルリチン投与により脾リンパ球中にコントラサプレッサー細胞が誘導されることが確認された。

【0029】同様の結果は0.1～100mg/kg量をラットやモルモットに腹腔内、s.c.（皮下）あるいはp.o.（経口）投与した際にも認められた。又グリチルリチンの連続投与を試みたところ、レクチン付着性細胞は薬剤の投与回数に依存して増加することが認められた。

【0030】<2>グリチルリチンにより誘導されたコントラサプレッサー細胞による抑制細胞を抑制する作用

（1）Con A誘発抑制細胞に対する作用

はじめに、コントラサプレッサー細胞が、Con Aにより誘発される抑制細胞を抑制する作用を、リンパ球混合培

養（MLR）系を用いて調べた。

【0031】BALB/cマウス（H-2<sup>d</sup>）由来脾リンパ球1 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mlを、24 $\mu$ g/mlのコンカナバリンA（Con A）で48時間培養することにより、抑制細胞（Lyt2<sup>+</sup> T細胞）を誘導した（アクタ・パソロジカ・マイクロバイオリジカ・イムノロジカ・スカンジナビア（Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica, Scandinavia, section C, 9, 277 (1982)）。

【0032】96穴マイクロプレートを用い、反応細胞（BALB/cマウス由来リンパ球、1 $\times$ 10<sup>6</sup>個/穴）と刺激細胞（C57BL/6マウス由来リンパ球）の一方方向MLRに、得られた抑制細胞とグリチルリチン投与（10mg/kg, i.p.）したBALB/cマウスより得られた脾リンパ球（コントラサプレッサー細胞）を2:2:1:2の比率で加え、37℃で5日間、5%CO<sub>2</sub>ふ卵器内で培養した。

【0033】培養終了24時間前に、1 $\mu$ Ci/穴のト

リチウムチミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) を添加した後、反応細胞への $^3\text{H}$ -TdRの取り込み量を液体シンチレーションカウンターにより測定することにより、抑制細胞の作用抑制を調べた。下記式により得られる抑制率を、図1に示した。

【0034】抑制細胞活性の抑制率 (%) =  $[1 - (\text{抑制細胞添加群のCPM} / \text{抑制細胞にグリチルリチン投与マウス由来脾リンパ球を添加した群のCPM})] \times 100$

【0035】その結果、グリチルリチンを投与したマウスより得られた脾リンパ球は、ConAにより誘発されたMLRの抑制活性を50~70%阻害した。同様の結果は、グリチルリチン投与マウス由来肝リンパ球あるいは末梢血中リンパ球でも認められ、ラットおよびモルモットに0.1~100mg/kgのグリチルリチンをs.c., i.v. およびi.p.投与した際にも確認された。

【0036】(2)火傷誘発抑制細胞に対する抑制作用次に、火傷により誘発される抑制細胞を用い、コントラ\*

\*サプレッサー細胞が抑制細胞を抑制する作用を調べた。

【0037】火傷(体表面積の30%、3度)を施したBALB/cマウス由来脾リンパ球(火傷6日後、 $1 \times 10^6$ 個)と、同系マウス由来脾リンパ球(反応細胞、 $1 \times 10^6$ )と、異系マウス(C57BL/6)由来脾リンパ球(刺激細胞)の三者で一方MLRを行い、MLRを制御する抑制細胞活性を調べた(イムノロジー・レターズ(Immunology Letters) 19, 33 (1988))。さらに、コントラサプレッサー細胞の活性を測定するために、反応細胞と刺激細胞と抑制細胞に対し、グリチルリチン投与(10mg/kg, i.p.)マウスより得た脾リンパ球を1:1:10:10:10の比率で加え、培養した。

【0038】前述の如く培養した後、反応細胞への $^3\text{H}$ -TdRの量を測定することにより火傷誘発抑制細胞の作用抑制を測定した。抑制率を表2に示す。

【0039】

【表2】

反応細胞と刺激細胞が 混合培養された細胞	抑制率 (%)
正常マウス由来脾リンパ球 (NSMNC)	—
火傷マウス由来脾リンパ球 (BSMNC)	80
グリチルリチン投与正常マウス由来脾リンパ球 (GR NSMNC)	—
グリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球 (GR BSMNC)	27
NSMNC+GR BSMNC	—
BSMNC+GR BSMNC	30

【0040】その結果、グリチルリチンを投与したマウスより得られた脾リンパ球により、火傷誘発抑制細胞の活性が50~80%阻害された。すなわち、グリチルリチン投与マウス由来脾細胞中にコントラサプレッサー細胞が誘導され、このコントラサプレッサー細胞により抑制細胞の作用が抑制された。

【0041】以上の結果から、コントラサプレッサー細胞は、ConA及び火傷のいずれにより誘発される抑制細胞に対しても、抑制する作用を有することが示された。

【0042】<3>グリチルリチンによる抑制細胞出現阻止作用

(1)火傷動物に対する抑制細胞出現阻止作用

BALB/Cマウスに火傷(体表面積の30%、3度)を施し、2日後および4日後に、グリチルリチンを腹腔内投与(10mg/kg)した。グリチルリチン投与あるいはグリチルリチン非投与の火傷マウスから経日的に得られた脾リンパ球を、同系マウス由来脾リンパ球(反応細胞)と異系マウス由来リンパ球(刺激細胞)の三者で一方MLRを行った。MLRは、反応細胞( $1 \times 10^6$ 個)に対し、刺激細胞とグリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球を1:1:10の比率で混合し、37℃で5日

間、5%CO<sub>2</sub>ふ卵器内で行った。前記と同様に抑制率を算出し、図2に示した。

【0043】その結果、グリチルリチン非投与の火傷マウスから経時的に得られた脾リンパ球(O)は、火傷4日目よりMLRを有意に抑制し始め、その活性は火傷6日目にピークに達し(60~80%抑制)、11日後には消失した。他方グリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球(●)は、同様のMLRを最大でも30%抑制(火傷6日後)するにすぎず、グリチルリチンにより火傷誘発の活性が顕著に阻害された。

【0044】また、このような脾リンパ球の効果は、V<sub>V</sub>レクチン付着性細胞を除去した時には消失したことから、グリチルリチン投与マウスで抑制細胞の活性が低いという結果は、グリチルリチンによりコントラサプレッサー細胞が誘導された事に起因するものである事が確認された。

【0045】(2)アロ抗原で誘導される抑制細胞阻止効果

BALB/c(H-2<sup>d</sup>)マウスを、マウス当り $5 \times 10^7$ 個のEL-4腫瘍細胞(H-2<sup>d</sup>)で免疫すると、アロ抗原反応性の抑制細胞が誘導される。グリチルリチンを投与(10mg/kg、



i. p.) したBALB/cマウスに同様の方法でアロリンパ球を移入し、得られた脾リンパ球をMLR系に添加した。培養後、反応細胞への<sup>3</sup>H-TdRの量を測定することによりアロ抗原反応性抑制細胞の量を測定した。

【0046】その結果、アロリンパ球を移植した時、抑制細胞の活性は移入3日目より検出され(30~50%抑制)、5~7日目をピークに(70~80%抑制)、9日目までに消失した。10mg/kgのグリチルリチンで処理したマウスに同様の方法でアロリンパ球を移植すると、上述の如くには抑制細胞活性が検出されず、ピークと見られる5日目でも抑制細胞の抑制率は20~40%にすぎなかった。

【0047】すなわち、グリチルリチンは火傷のみならずアロ抗原により誘導される抑制細胞に対しても出現を阻止する作用を有することが確かめられた。この事実はすでに雑誌で発表されている(医学のあゆみ、158巻、135頁(1991))が、コントラサプレッサー細胞の関与、コントラサプレッサー細胞がグリチルリチンにより誘導されることについては、記載されていない。

【0048】(3) 担癌動物における抑制細胞出現阻止作用

BALB/cマウスの左腹部にマウス当り $1 \times 10^5$ 個のMeth A 腫瘍細胞を移植した7~10日後に再度同量の腫瘍細胞を右腹部に移植しても、随伴免疫のため2次移植腫瘍\*

\*の増殖は認められない。これに対し移植20日後に同様の条件で腫瘍の再移植を試みると、腫瘍の増殖に伴って出現した抑制細胞の働きにより随伴免疫が破壊され、2次移植腫瘍の増殖が認められる(ジャーナル・オブ・エクスperimental・メデシシ(Journal of Experimental Medicine) 159, 1295 (1984))。

【0049】同様の実験系で、腫瘍細胞を1次移植した7日目に、グリチルリチン(10mg/kg, i. p.)を頻回投与した別のマウスより得られた脾細胞を移入し、その13日後に担癌マウスから得られた脾リンパ球中の抑制細胞の活性をMLRにより測定した。

【0050】鼠径部皮下に $1 \times 10^5$ 個のMeth A腫瘍を移植した7日目のBALB/c担癌マウスに、同系正常マウスにグリチルリチン投与(10mg/kg, i. p., 1日おきに2回)により得られた脾細胞(マウス当り $1 \times 10^5$ 個)を静脈より移入した。尚、対照群には、担癌7日後のマウスに正常マウスより得られた脾細胞を同じく移入した。腫瘍移植20日目にそれぞれ得た担癌マウス由来脾リンパ球の抑制細胞活性を、前記<3>(1)と同様に、5日間培養の一方向MLRにより測定した。結果を表3に示す。

【0051】

【表3】

反応細胞と刺激細胞が 混合された細胞	MLRに対する抑制率 (%)
正常マウス由来脾細胞を移入された 担癌マウス脾リンパ球	80
グリチルリチン投与マウス由来脾細胞を移入された 担癌マウス脾リンパ球	20

【0052】その結果、グリチルリチン非投与の担癌マウス由来脾リンパ球がMLRを80%抑制したのに対し、グリチルリチン投与マウス由来脾細胞を移入された担癌マウスのそれでは、MLRは20%しか抑制されなかった。

【0053】すなわち、グリチルリチン投与マウス由来脾細胞中には、1次腫瘍移植によって誘導される抑制細胞を排除する作用が存在する訳である。しかし当該脾細胞よりVVレクチン付着性細胞を除去するとその活性も失われることから、グリチルリチンによる抑制細胞抑制作用が、コントラサプレッサー細胞の誘導を介して生じた現象であることが確認された。

【0054】<4>グリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞による感染軽減作用  
火傷動物のHSV-1感染に対するグリチルリチンの作用を調べた

火傷直後のマウスにHSV-1を感染させ、同時にグリチルリチン(10mg/kg, i. p.)を投与あるいはグリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞を移入し、マウスの生存を観察した。

【0055】BALB/cマウスに火傷(体表面積の30%、3度)を施した2時間後、グリチルリチンを投与(10mg/kg  $\times$  2, i. p.)することにより誘導したコントラサプレッサー細胞( $1 \times 10^5$ 個/マウス)を、火傷マウスに静脈より移入した。火傷マウス(○)およびコントラサプレッサー細胞の移入を受けた火傷マウス(●)に、火傷マウスの95%が感染死する量のHSV-1を腹腔に感染させ、15日間マウスを観察した。結果を図3に示す。

【0056】その結果、グリチルリチンの投与により全体の90%の火傷マウスがHSV-1による感染死を免れた。又同様のHSV-1感染火傷マウスに、グリチルリチン

13

により誘導したコントラサプレッサー細胞を能動的に静脈移入すると、その死亡率が10%まで低下した。脾細胞の能動移入の前にVVレクチン付着性細胞画分を除去するとこの様な活性が消失する事から、グリチルリチンによるHSV-1感染火傷マウスの防御は、グリチルリチンにより誘導されたコントラサプレッサー細胞を介して生じた現象であることが確かめられた。

【0057】以上説明したように、グリチルリチンはコントラサプレッサー細胞を誘導する作用を有し、コントラサプレッサー細胞を介して、抑制細胞の作用を抑制し、また抑制細胞の出現を阻止する作用を有し、さらに、その結果、感染を阻止する作用を有する。

【0058】＜5＞グリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞による感染治療作用

火傷直後のマウスにHSV-1を感染させ、その24時間後にグリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞を移入し、マウスの生存を確認した。

【0059】BALB/cマウスに火傷を施した2時間後、火傷マウスの95%が感染死する量のHSV-1を腹腔に感染させ、その1日後にBALB/c normalマウスにグリチルリチンを投与(10mg/kg, i.p.)することにより誘導したコントラサプレッサー細胞(1×10<sup>6</sup>個/マウス)を、HSV-1感染火傷マウスに静脈より移入し、15日間マウスを観察した。結果を図4に示す。

【0060】また、感染3、4、5日後に脾臓および肝臓を摘出し、臓器内のウイルス量を、VERO細胞を用いたブラーク法により定量した。結果を図5に示す(A:脾臓、B:肝臓)。

【0061】その結果、グリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞の移入により、80%の火傷マウスがHSV-1による感染死を免れた(図4)。また、グリチ

14

ルリチン誘導コントラサプレッサー細胞を移入された感染火傷マウスは、感染後の脾臓および肝臓中のウイルス量が、非移入群と比較して著しく減少していた(図5)。

【0062】以上説明したように、グリチルリチンにより誘導されるコントラサプレッサー細胞には、抑制細胞の作用を抑制し、その結果感染を治療する作用を有する。尚、グリチルリチンにシステインとグリシンを加えた生理食塩水溶液を用いた場合も、以上と同様の作用を有する。

【0063】＜6＞グリチルリチンで誘導されるコントラサプレッサー細胞の性状

グリチルリチンで誘導されたコントラサプレッサー細胞の性状を調べた。グリチルリチン投与(10mg/kg, i.p., 1日おきに2回)マウスより得た脾リンパ球を、各種単一抗体(4℃、40分)と補体(37℃、40分)で処理した。処理方法は、イムノロジー・レターズ(Immunology Letters 19, 33頁(1988)記載の方法に従った。

【0064】これらの処理細胞(1×10<sup>6</sup>個)と火傷誘発抑制細胞(火傷6日後、1×10<sup>6</sup>個)とを、＜2＞(1)と同様に5日間培養のone-way システムのMLRに添加し、抑制細胞の活性に対する阻止活動を指標にその性状を検討した。その結果、グリチルリチンで誘導されるコントラサプレッサー細胞はCD3、L3T4単一抗体で感受性で、Ly 2.2単一抗体に非感受性であり、CD3陽性、CD4陽性、CD8陰性のT細胞である事が判明した(表4)。

【0065】

【表4】

グリチルリチン誘発コントラ サプレッサー細胞の処理	火傷誘発抑制細胞 に対する制御率 (%)
補体のみ	75
anti CD3 単一抗体 + 補体	0
anti L3T4 単一抗体 + 補体	1
anti Lyt 1.2 単一抗体 + 補体	0
anti Lyt 2.2 単一抗体 + 補体	76
anti Ig 抗血清 + 補体	76
火傷誘発抑制細胞の処理	処理後に残存した 抑制細胞の活性 (%)
補体のみ	80
anti CD3 単一抗体 + 補体	1
anti L3T4 単一抗体 + 補体	81
anti Lyt 1.2 単一抗体 + 補体	82
anti Lyt 2.2 単一抗体 + 補体	2
anti Ig 抗血清 + 補体	78

【0066】尚、グリチルリチンにシステインとグリシンを加えた生理食塩水溶液を用いても、同様であった。

【0067】＜7＞火傷により誘発される抑制細胞の性状

火傷6日目のマウス由来脾リンパ球を細胞表面マーカーに対する各種単一抗体および補体で処理した後、抑制細胞の性状をMLRにて検討した。その結果、火傷誘発抑制細胞は、CD3およびLyt 2.2単一抗体に感受性で、L3T4単一抗体に非感受性であり、CD3陽性、CD4陰性、CD8陽性のT細胞であることが判明した(表4)。これはすでに雑誌で報告されている結果と同様である(ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ(Journal of Surgical Research) 38, 606 (1985))。

【0068】尚、グリチルリチンにシステインとグリシ

ンを加えた生理食塩水溶液を用いても、同様であった。

【0069】＜8＞グリチルリチンで誘導したコントラサプレッサー細胞の火傷誘発抑制細胞に対する阻止能  
マウスに、グリチルリチン処理(10mg/kg, i.p., 1日おきに2回投与)マウス由来の脾コントラサプレッサー細胞と、火傷誘発抑制細胞(火傷6日後)とを様々な比率(1:0.1~1:1)で混合した後、MLRにてコントラサプレッサー活性を測定した。その結果、火傷マウス由来抑制細胞の抑制活性を完全に除去するには同量のコントラサプレッサー細胞が必要であった(表5)。

【0070】

【表5】

火傷誘発抑制 細胞の数	グリチルリチン誘導コントラ サブレッサー細胞の数	コントラサブレッサ ー活性(%)
	0	—
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	20
	$5 \times 10^4$	20
	$1 \times 10^5$	80
$5 \times 10^5$	0	—
	$5 \times 10^5$	78
$1 \times 10^6$	0	—
	$1 \times 10^5$	20
	$5 \times 10^5$	50
	$1 \times 10^6$	75

【0071】尚、グリチルリチンにシステインとグリシンを加えた生理食塩水溶液を用いても、同様であった。

【0072】

【実施例】以下に、本発明の実施例を説明する。

グリチルリチン

バレイショデンブ

ステアリン酸マグネシウム

\*【0073】

【製剤例】

20 <製剤例1>錠剤

\* 下記組成の混合物を常法により錠剤とする。

25mg

220mg

5mg

合 計

300mg

【0074】<製剤例2>糖衣錠

※ 下記組成の混合物を常法により糖衣錠とする。

グリチルリチン

25mg

グリシン

25mg

メチオニン

25mg

炭酸カルシウム

適量

乳糖

適量

カルボキシメチルセルロース

適量

合 計

300mg

【0075】<製剤例3>注射剤

グリチルリチン200mgを生理食塩水に溶解し、100mlとする。

【0076】<製剤例4>注射剤

グリチルリチン200mg、グリシン2000mg、システイン100mgを生理食塩水に溶解し、100mlとする。

【0077】

【発明の効果】本発明により、抑制細胞の作用を抑制するコントラサブレッサー細胞を誘導することができる。また、コントラサブレッサー細胞を誘導することにより、低免疫症患者の日和見感染、敗血症等を軽減、治療することができる。

【0078】さらに、本発明により誘導された健常人のコントラサブレッサー細胞を、患者に移入することによ

って、重度の患者に対しても日和見感染を軽減、治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 グリチルリチン投与マウス由来コントラサブレッサー細胞によるConA誘発抑制細胞の作用抑制を示す図。

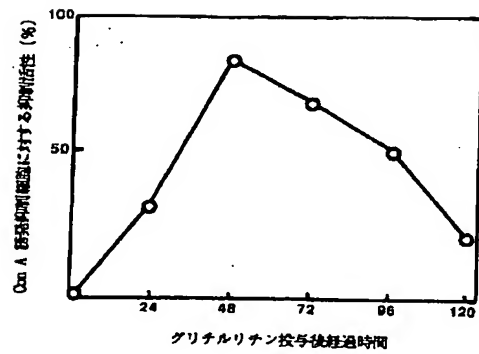
【図2】 火傷マウスにおけるグリチルリチンの抑制細胞出現阻止効果を示す図。

【図3】 火傷マウスのHSV-1感染に対するグリチルリチン誘導コントラサブレッサー細胞による感染防御効果を示す図。

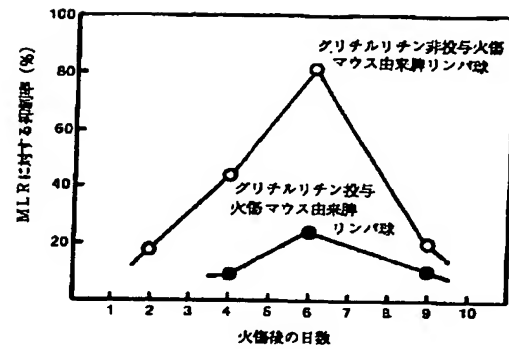
【図4】 火傷マウスのHSV-1感染に対するグリチルリチン誘導コントラサブレッサー細胞による感染治療効果を示す図。

【図5】 臓器中のHSV-1量を示す図。

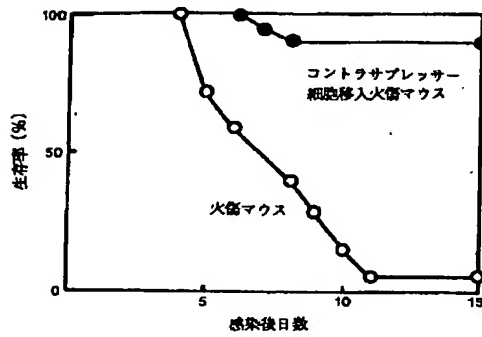
【図1】



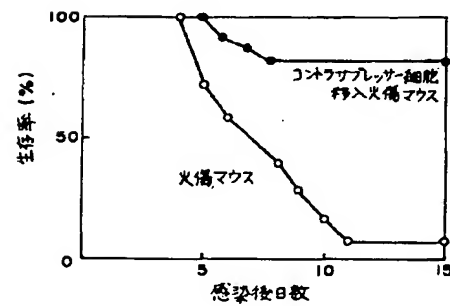
【図2】



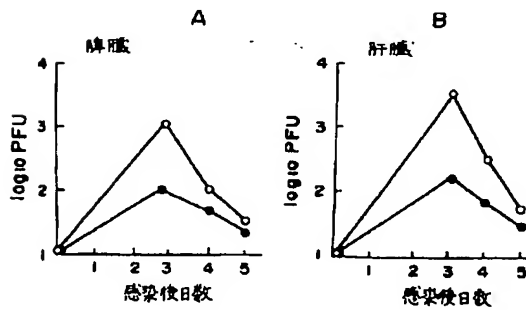
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 小林 真紀子  
アメリカ合衆国 テキサス州 77550 ガ  
ルベストン市 フェリー ロード 500、  
#414

(72)発明者 宇都宮 徳一郎  
アメリカ合衆国 テキサス州 77551 ガ  
ルベストン市 セントラル シティ ブル  
バード 6315、#117

(72)発明者 宇都宮 栞三  
神奈川県大和市下鶴間4260